

Aurora-B在宫颈癌组织中的表达与其 靶向抑制剂ZM447439增强紫杉醇化疗 作用的基础研究

刘国燕 李君 李力 郭祥翠

河南省新乡市中心医院妇科妇瘤科, 河南 新乡 453000

[摘要] **背景与目的:** Aurora激酶是调节细胞有丝分裂过程的重要激酶, 其在众多肿瘤中呈过度表达, 该激酶也就成为新的肿瘤治疗靶点之一。本研究旨在探讨Aurora-B蛋白在宫颈癌中表达及其与宫颈癌临床病理参数的相关性, 同时研究Aurora-B靶向抑制剂增强紫杉醇对宫颈癌细胞株SiHa化疗的作用。**方法:** 应用免疫组化法分析70例宫颈癌、46例CIN II和21例正常宫颈病理切片。应用MTT法检测了ZM447439、紫杉醇对宫颈癌细胞株的增殖抑制试验。并且通过Western blot分析了SiHa细胞在ZM447439处理后凋亡相关蛋白表达。**结果:** 发现宫颈癌中Aurora-B蛋白高表达(50/70, 71.43%), 在鳞癌中高表达(42/50, 84%), 并且与细胞分化程度相关($P=0.0003$)。ZM447439作用于SiHa细胞株后有明确的随时间和剂量相关的增殖抑制, 并且ZM447439可以对紫杉醇有明显的化疗协同作用($Q>1.15$)。经Western blot证实ZM447439通过升高P53水平促进SiHa细胞凋亡。**结论:** 宫颈癌中Aurora-B蛋白高表达, 靶向Aurora-B的ZM447439可以协同增强紫杉醇对宫颈细胞株抑制作用。

[关键词] 宫颈肿瘤; Aurora-B; 靶向治疗; 紫杉醇

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.07.013

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)07-0545-05

Basic study on Aurora-B expression in cervical cancer and targeted inhibitor ZM447439 enhances paclitaxel anti-tumor activity in cervical cancer LIU Guo-yan, LI Jun, LI Li, GUO Xiang-cui (Department of gynecological, department of gynecological tumor, Xinxiang Central Hospital in Henan Province, Xinxiang Henan 453000, China)

Correspondence to: LIU Guo-yan E-mail: lgy8280@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Aurora kinases, frequently detected to be over-expressed in some human tumors, regulate many essential events during tumor cell mitosis progression and have been regarded as potentially important targets for cancer therapy. This study was designed to detect Aurora-B expression in cervical carcinoma, explore the relation Aurora-B expression and clinicopathologic feature. So, Aurora-B kinase inhibition ZM447439 was used to investigate the effect of ZM447439 on SiHa cell line and the synergy effect with paclitaxel. **Methods:** Detected Aurora-B protein in cervical carcinoma(70 patients), CIN II (46 patients) and normal cervix(21patients) by immunohistochemistry. The inhibitory effects of ZM447439 and paclitaxel in SiHa cell line were investigated by MTT based assay, The expression of apoptosis associated protein was measured by Western blot. **Results:** The rate of Aurora-B expression is 71.43% in cervical cancer, with no significant correlation to clinical stage, age, lymph node metastasis, vascular invasion ($P>0.05$). Aurora-A protein expression has significant correlation to pathological type and grade($P<0.05$). Enhanced antiproliferative effects were found when SiHa cells were cultured with ZM447439. Synergic effect of ZM447439 combined with paclitaxel was found in SiHa cell line($Q>1.15$). The level of P53 was increased significantly through ZM447439 treatments with Western blot. **Conclusion:** Our data provides strong evidence that high expression of Aurora-B in cervical cancer. The targeted Aurora-B inhibitors, ZM447439, can enhance paclitaxel anti-tumor activity in cervical cancer.

[Key words] Cervical carcinoma, Aurora-B, Targeted therapy, Paclitaxel

晚期宫颈癌和复发性宫颈癌预后差, 目前对这部分的患者主要是药物治疗联合放疗或姑息性手术治疗, 药物化疗的毒性和肿瘤细胞的药物敏感性、化疗耐药是目前治疗的主要问题^[1]。寻找有效的化疗药物或化疗方案、减轻化疗毒性是提高该类患者疗效的关键之一, 寻找宫颈癌发病机制中新的治疗靶点是目前广大妇科肿瘤医师的主要研究方向。作为哺乳动物细胞Aurora激酶家族成员之一, Aurora-B是染色体的过客蛋白, 对于染色体的正确排列和分离有着非常重要的作用, Aurora-B激酶被抑制导致染色体浓缩被抑制, 阻碍细胞进入有丝分裂^[2]。研究发现Aurora-B在许多肿瘤中存在过表达, 抑制其表达可抑制细胞增殖、促进细胞凋亡^[3-4]。本研究探讨Aurora-B在宫颈癌中表达, 并研究Aurora-B靶向抑制剂协同紫杉醇对宫颈癌细胞株化疗作用。

1 资料和方法

1.1 组织标本和细胞株

收集2011年1月—2011年12月在我院手术后保存的病理蜡块, 其中宫颈癌(广泛全子宫+盆腔淋巴结清扫术)70例, CIN II(宫颈锥切术)46例, 正常宫颈(子宫肌瘤手术)21例。所有患者资料随访2年。SiHa细胞株购自中科院上海细胞库。

1.2 仪器、试剂与方法

兔多克隆抗Aurora-B抗体(美国Santa cruz公司); SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德公司), 所有免疫组化试验按照博士德公司提供的说明进行。免疫组化结果由1名高年资病理医师判读, 判读标准: 每张片子随机选用3个肿瘤高倍视野, 按照阳性细胞的百分比分为4组: 没有阳性染色的为阴性; <10%的阳性细胞染色为弱阳性(1+); 10%~30%阳性细胞染色为中等强度阳性(2+); >30%的细胞阳性染色为强阳性染色(3+)。

细胞株用中科院上海细胞库推荐的培养基加10%胎牛血清培养, 传代时用0.25%的胰蛋白

酶消化, 按1:3的比例传代。ZM447439购自美国Selleck公司, 紫杉醇购自扬子江药业有限公司, MTT购自美国Sigma公司。细胞药物敏感性试验用MTT法, 将处于对数生长期的人宫颈癌细胞制成 1×10^4 /mL的细胞悬液, 每孔200 μ L, 加至96孔培养板。实验设药物处理组、空白对照组(每组设5个复孔), ZM447439处理组的浓度分别为: 62.5、125、250、500、1 000、2 000 nmol/L置37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%的培养箱内培养24、48、72 h, 每孔加MTT (5 mg/mL)20 μ L, 继续培养4 h, 去上清液, 每孔加150 μ L DMSO, 在微量振荡器上振荡10 min, 静置10 min, 然后经自动酶标读数仪测定A₄₉₀值。药物作用效应即抑制率 (fa)=(1-试验组平均A值/肿瘤细胞对照组平均A值)×100%。

ZM447439联合紫杉醇对宫颈癌细胞株的化疗协同试验, 按照前述的MTT法接种细胞于96孔板, 紫杉醇处理组的浓度分别为: 2、4、8、16 nmol/L。ZM447439与紫杉醇联合作用: 采用细胞毒性约为10%的低浓度ZM44743962, 5 nmol/L与紫杉醇2、4、8、16 nmol/L联用, 按前述方法培养72 h, 测定A₄₉₀值, 计算抑制率。按金氏公式(Q=Ea+b/Ea+Eb-Ea×Eb)评价2种药物合用是否有协同或拮抗作用, 公式中Ea+b为联合用药时肿瘤细胞增殖抑制率, Ea、Eb分别为A药、B药单独用药时的抑制率。若Q值在0.85~1.15范围内为2药合用单纯相加, Q值>1.15为增强, Q值<0.85则表示2药合用有拮抗作用^[5]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理。计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料采用非参数检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Aurora-B在不同宫颈组织中的表达

免疫组化结果显示Aurora-B蛋白的表达定位于细胞核, 为棕褐色颗粒, 70例宫颈癌中50例阳性染色, 阳性率71.43%; 46例CIN中10

例阳性，阳性率21.74%，21例正常宫颈无阳性表达，组间两两比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Aurora-B表达与宫颈癌的临床病理特征相关性分析

在70例宫颈癌患者中经免疫组化检测Aurora-B蛋白的表达结果与临床病理特征相关性分析如下：年龄不影响Aurora-B蛋白的表达，年龄 ≥ 40 岁阳性率71%(32/45)，年龄 < 40 岁阳性率72%(18/25)，2组差异无统计学意义。在病理类型方面，鳞癌Aurora-B蛋白表达阳性率高于腺癌病例，鳞癌阳性率84%(42/50)，腺癌阳性率40%(8/20)，2组差异有统计学意义($P = 0.001$)。在组织分化上，肿瘤分化与Aurora-B蛋白的表达有相关性，分化G₁、G₂、G₃的阳性率分别为38%(10/26)、83.3%(20/24)、100%(20/20)，3组差异有统计学意义($P = 0.0003$)。在FIGO分期方面，I_A、I_B、II_A、II_B的阳性率分别为70%(2/5)、73.9%(17/23)、76.7%(23/30)、50%(6/12)，各组间差异无统计学意义($P = 0.167$)。在淋巴结转移方面，盆腔淋巴结转移组的阳性率为69%(11/16)，淋巴结未转移组的阳性率为72%(39/54)，差异无统计学意义($P = 0.736$)。在脉管浸润方面，脉管浸润组阳性率为76.2%(16/21)，无脉管浸润组阳性率为67.3%(33/49)，差异无统计学意义($P = 0.213$)。

2.3 ZM447439和紫杉醇对宫颈癌细胞株增殖抑制影响

ZM447439和紫杉醇对宫颈癌细胞株增殖抑

制影响具体见图1和图2，由此可见ZM447439对SiHa细胞株的增殖抑制呈时间和剂量依赖性。

2.4 ZM447439和紫杉醇联合作用SiHa细胞的协同作用

ZM447439和紫杉醇联合作用SiHa细胞72 h后细胞抑制率大于单独用药，在ZM447439 62.5 nmol/L(IC₁₀, 10%抑制率浓度)、125 nmol/L(IC₂₀, 20%抑制率浓度)下紫杉醇作用于SiHa细胞有较强的协同增强化疗作用($Q > 1.15$)。因为在ZM447439浓度为125 nmol/L下加用紫杉醇的浓度高于6 nmol/L是大部分细胞基本死亡漂浮，不能进行MTT检测。从结果看加用ZM447439后紫杉醇对细胞株抑制率明显增加，Q值均 > 1.15 为抑制增强作用(表1)。

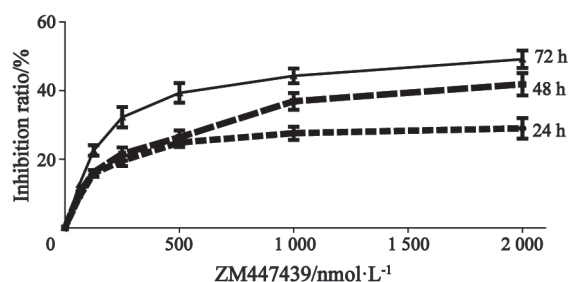


图1 ZM447439对SiHa细胞株抑制率

Fig. 1 SiHa cell line inhibition rate for ZM447439

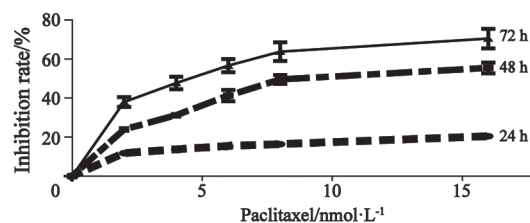


图2 紫杉醇对SiHa细胞株抑制率

Fig. 2 SiHa cell line inhibition rate for paclitaxel

表1 ZM447439联合紫杉醇对SiHa细胞株的抑制作用分析

Tab. 1 Inhibition of SiHa cell line combined ZM447439 with paclitaxel

Paclitaxel/nmol · L ⁻¹	ZM447439/nmol · L ⁻¹	Inhibition rate/%	Q value	ZM447439/nmol · L ⁻¹	Inhibition rate/%	Q value
0	62.5	10.2±1.7		125	20.4±2.7	
2	0	35.8±3.2	1.21	0	35.7±3.2	1.42
	62.5	55.2±4.4		125	69.2±5.1	
4	0	46.0±3.7	1.40	0	46.0±3.7	1.37
	62.5	71.6±2.1		125	78.5±7.1	
6	0	48.5±3.0	1.31	-	-	-
	62.5	79.4±6.1		-	-	-
8	0	57.4±3.4	1.36	-	-	-
	62.5	83.9±7.8		-	-	-
16	0	62.8±3.1	1.29	-	-	-
	62.5	85.9±6.0		-	-	-

2.5 ZM447439对SiHa细胞株中P53、Bcl-2蛋白表达的影响

在6孔板中每孔种 6×10^4 个细胞, 细胞贴壁后分别加入ZM447439($1 \mu\text{mol/L}$)、紫杉醇(4 nmol/L)和二者联合用药, 用药24 h后收集细胞, 细胞裂解后进行Western blot检测Aurora-B、P53、Bcl-2蛋白的表达。如图3所示。在ZM447439处理后, Aurora-B表达减少, P53水平升高, 抗细胞凋亡蛋白Bcl-2有轻度下降。

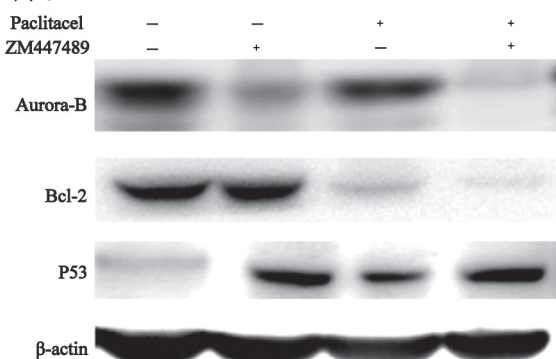


图3 ZM447439($1 \mu\text{mol/L}$)、紫杉醇(4 nmol/L)和二者联合用药处理后凋亡相关蛋白表达

Fig. 3 Apoptosis related proteins expression in SiHa cell line with/combined ZM447439($1 \mu\text{mol/L}$), paclitaxel (4 nmol/L)

3 讨 论

Aurora激酶作为有丝分裂调节者家族之一, 近年来受到生物学家的广泛重视, 尤其是Aurora-A被认为是在许多肿瘤中过表达, 被认为是肿瘤恶变过程中关键过程之一^[6]。随着人们对Aurora激酶家族的深入研究, 现在人们发现Aurora-B虽然是细胞染色体的过客蛋白, 对于染色体的正确排列和分离有着非常重要的作用, 进一步的研究发现在许多肿瘤中均有Aurora-B的过表达, 并且与肿瘤的发生、发展密切相关^[7]。所以Aurora激酶日益成为肿瘤治疗研究的靶点。本研究在分析70例宫颈癌组织发现, Aurora-B在宫颈癌中呈过表达, 并且与肿瘤的分化程度相关, 另外鳞癌较腺癌有更高的阳性率。由于本组资料随访时间仅2年左右, 故本研究未进一步分析Aurora-B与宫颈癌预后

和复发的相关性。现有的资料提示Aurora-B的表达与宫颈癌的预后无关, 但可能是宫颈癌发生进程中重要步骤之一^[8]。

ZM447439是一种选择性的ATP竞争性Aurora B抑制剂, 它可以选择性抑制Aurora B及其下游目的蛋白H3的磷酸化, 从而可以抑制染色体排列、纺锤体检查点功能和胞质的分裂^[9]。Girdler等^[10]通过RNA干扰和诱导突变等技术研究证实ZM447439引起肿瘤细胞形态和生物学行为的改变是通过抑制Aurora-B活性所致。本研究选用宫颈鳞癌SiHa细胞株在ZM447439作用24、48、72 h后细胞增殖情况, 发现随着ZM447439浓度的升高细胞抑制率逐渐上升, 在相同浓度下随着时间的延长, 细胞抑制率也是逐渐增加, 与紫杉醇有相似的细胞抑制作用。由此可见ZM447439作为宫颈癌治疗药物的具有进一步研究的潜在治疗价值。

我们为进一步探讨ZM447439与紫杉醇的化疗作用, 我们应用ZM447439抑制率为10%左右的浓度 62.5 nmol/L 为基准添加计量, 分析了紫杉醇在2、4、6、8、16 nmol/L 浓度下对SiHa细胞的抑制率发现, 按照金氏公式计算出协同作用的Q值, 均大于1.15, 说明ZM447439可以协同增强紫杉醇的化疗作用, 为今后ZM447439应用于临床后联合化疗提供了新的理论支持。

在分析ZM447439作用于SiHa细胞后, 我们发现ZM447439可以导致P53的水平升高, 细胞凋亡增加, 减弱了Bcl-2的抗凋亡作用, 从而导致细胞凋亡。这与文献报道的ZM447439作用机制相同^[11]。ZM447439同时具有靶向抑制Aurora-a的抑制作用, 在高浓度下同时具有抑制MEK1、Src的作用^[9], 而这些蛋白都是肿瘤细胞中关键的步骤之一, 并且抑制Aurora后与提高肿瘤的放疗敏感性相关^[12], 由此可见ZM447439具有广泛的临床应用前景, 但是还需要进一步的临床试验验证。

[参 考 文 献]

- [1] ELIT L M, HIRTE H. Management of advanced or recurrent cervical cancer: chemotherapy and beyond [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2014, 14(3): 319-332.

[2] YEUNG S C, GULLY C, LEE M H, Aurora-B kinase inhibitors for cancer chemotherapy [J] . Mini Rev Med Chem, 2008, 8(14): 1514-1525.

[3] TANAKA, ARII S, YASEN M, et al. , Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy [J] . Br J Surg, 2008, 95(5): 611-619.

[4] WU X, LIU W, CAO Q, et al. Inhibition of Aurora B by CCT137690 sensitizes colorectal cells to radiotherapy [J] . J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33(1): 13.

[5] JIN ZJ. About the evaluation of drug combination [J] . Acta Pharmacol Sin, 2004. 25(2): 146-147.

[6] NIKONOVA A S, ASTSATUROV I, SEREBRIISKII I G, et al. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division [J] . Cell Mol Life Sci, 2013, 70(4): 661-687.

[7] 董丹丹, 肖燕燕, 刘伟, 等. Aurora-B激酶及其抑制剂研究进展 [J] . 药学报, 2013, 48(4): 457-465.

[8] TWU N F, YUAN C C, YEN M S, et al. Expression of aurora kinase A and B in normal and malignant cervical tissue: high aurora a kinase expression in squamous cervical cancer [J] . Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 142(1): 57-63.

[9] LI M, JUNG A, GANSWINDT U, et al. Aurora kinase inhibitor ZM447439 induces apoptosis via mitochondrial pathways [J] . Biochem Pharmacol, 2010, 79(2): 122-129.

[10] GIRDLER F, GASCOIGNE K E, EYERS P A, et al. Validating Aurora B as an anti-cancer drug target [J] . J Cell Sci, 2006, 119(Pt 17): 3664-3675.

[11] BALDINI E, TUCCILLI C, PRINZI N, et al. The dual Aurora kinase inhibitor ZM447439 prevents anaplastic thyroid cancer cell growth and tumorigenicity [J] . J Biol Regul Homeost Agents, 2013, 27(3): 705-715.

[12] 孙会贞, 杨恭. Aurora-A促进胰腺癌细胞放射抵抗的机制研究 [J] . 中国癌症杂志, 2013, 23 (12): 974-979.

(收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-06-06)

『 肿瘤治疗规范及放疗进展 』 2014 上海学习班 第一轮通知

由上海医学会肿瘤放射治疗专科分会主办, 复旦大学附属肿瘤医院承办的『 肿瘤治疗规范及放疗进展 』 2014 上海学习班, 将于 2014 年 8 月 13~15 日在上海举办。会议将邀请东部地区放疗专家授课, 系统介绍常见恶性肿瘤的治疗规范及放疗进展, 主要面向高年住院医师和主治医师。会议课程如下, 请有意参会人员填写会议回执时并就自己感兴趣内容予以标记, 我们将根据大家的意愿对授课内容做适当调整。真诚欢迎全国的放疗同道积极参与。

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 原发性肝癌治疗规范 2. 肺癌治疗规范及放疗进展 3. 食管癌治疗规范及放疗进展 4. 胃癌治疗规范及放疗进展 5. 恶性肿瘤的粒子治疗 6. 直肠癌治疗规范及放疗进展 7. 鼻咽癌治疗规范及放疗进展 8. 头颈部肿瘤综合治疗规范 9. 头颈部肿瘤放疗中正常组织损伤和防护 10. IV期恶性肿瘤的放射治疗 | <ol style="list-style-type: none"> 11. 乳腺癌治疗规范及放疗进展 12. 淋巴瘤诊治进展 13. 前列腺癌治疗规范及放疗进展 14. 放射治疗物理新技术 15. 常见组织器官的放疗物理剂量限制值 16. 宫颈癌内外联合照射治疗方案的剂量学评估 17. 临床放射生物学进展 18. 实体恶性肿瘤的立体定向放射治疗 19. 以放疗为基础的多学科综合治疗理论基础和临床应用 |
|---|---|

注册费用: 800 元, 食宿自理 (8 月 13 日 -8 月 15 日长航宾馆会议价, 大标间 110 元 / 床 / 日)

学 分: 国家级医学继续教育 I 类学分 10 分【2014-09-03-062】(国)

报到时间: 2014 年 8 月 13 日上午 9 点 - 晚上 10 点 (本市学员可在 14 日上午会场注册)

报到地点: 上海市零陵路 518 号长航宾馆一楼大厅 (复旦大学附属肿瘤医院对面)

会议地点: 上海市东安路 270 号复旦大学附属肿瘤医院 2 号楼 5 楼小会议厅

联 系 人: 王祥洪 13621674393, 李云海 13524251746

参加学习班回执 (复印有效)

姓 名	单 位 / 地 址 / 邮 编	手 机	电 子 邮 箱	感 兴 趣 内 容 编 号

回执可通过电子邮件发至 liyunhai@csc.org.cn